SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計　LCMS™-8060NX

トリプル四重極質量分析計を用いた麻痺性貝毒一斉分析

小林 まなみ

ユーザーベネフィット

- ◆ LC-MS/MS法により、サキシトキシン(STX)、デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)、ネオサキシトキシン(NEO)、デカルバモイルネオサキシトキシン(dcNEO)、ゴニオトキシン(GTX1～4)、プロトゴニオトキシン(C1～2)、デカルバモイルゴニオトキシン(dcGTX2、dcGTX3)の12分子種の一斉分析が可能です。
- ◆ シンプルなLCシステムを用いて、1分析15 minの高速分析が可能です。

■はじめに

貝毒は、主に二枚貝（ホタテガイ、アサリ、カキ等）が毒を持った海産渦鞭毛藻を捕食し、体内に毒が蓄積することで発生します。毒化した貝をヒトが食べると中毒症状を引き起こすことがあり、中毒症状により下痢性貝毒、麻痺性貝毒、神経性貝毒、記憶喪失性貝毒等に分類されます。日本で問題となる貝毒は、主に麻痺性貝毒と下痢性貝毒であり、その毒素は複数の毒成分群により構成されます。

日本では、食品衛生法に基づき貝毒に関する安全基準、規制値が設定されています(平成27年3月6日付け食安発0306第1号)。二枚貝等の可食部に含まれる毒力または毒量は、麻痺性貝毒で4マウスユニット/g 以下、下痢性貝毒で0.16 mg オカダ酸当量/kg 以下と定められています。この麻痺性貝毒の規制値は、CODEXのCXS 292-2008、EC規則853/2004の基準値の 800 µg STX·2HCl equivalent/kg に相当します。現在の検査法は、麻痺性貝毒についてはマウス毒性試験法が、下痢性貝毒には平成27年3月6日付け食安基発0306第3号が通知されており、すでにLC-MS/MSを使用した機器分析法に移行しています。一方で、農林水産省は諸外国の状況を鑑み、麻痺性貝毒検査についても機器分析法の多機関妥当性評価を実施し、ガイドライン化事業を進めています。

国際的に麻痺性貝毒の検査法は、カナダ、米国の一部、ノルウェーなどで使用されている、The International Ship Security Certificate(ISSC)にて承認済みであるポストカラム酸化蛍光検出LC 法（J. AOAC Int. 2011, 94, 1154–1176）や、英国、アイルランド、ポルトガル、ニュージーランドなどが使用している2019年1月よりEUの公式参照法（Official Reference Method）となったプレカラム酸化蛍光検出LC法(AOAC 2005.06)があります。ただし、これらのHPLCシステムはシステムおよび分析操作が煩雑であることから、近年は、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を使用した超高速LC-MS/MS法[1)2)]も開発されています。2018年には21機関が参加し国際妥当性評価[3)]も実施され、LC-MS/MSを使用した機器分析法も、HPLC法と並んで有効とされています。

本稿では、親水性相互作用クロマトグラフィーLC-MS/MS法で毒化したホタテ貝試料を分析した事例をご紹介します。

■サキシトキシンの構造

サキシトキシン(STX)の一般構造を図１に示します。同族体として、R1に水酸基、R2やR3に硫酸エステル、R4の側鎖にカルバモイル窒素がスルホン化した構造など、多数の分子種の存在が明らかになっています。

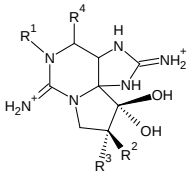

図1　STX一般構造

表１に、麻痺性貝毒関連の分子種について、R1～4部位における各官能基とToxicity Equivalency Factors (TEF)を示しました。総毒性は、検出された各分子種のモル濃度にTEFを乗じた合計値により算出することとされています。

また今回、STX、dcNEO、dcGTX2、 dcGTX3は標準品の入手が困難であったため、これら分子種については、標準品が入手可能であった類似分子種による検量線を使用し計算しました。表1のCalibrant列で各分子種に対する検量線分子種を示しました。

表1　麻痺性貝毒分子種の各官能基とTEF

Group	Analog	R1	R2	R3	R4	TEF	Calibrant
C toxins	C1	H	H	OSO_3^-	$COCONHSO_3^-$	0.01	C1
	C2	H	OSO_3^-	H	$COCONHSO_3^-$	0.1	C2
	C3	OH	H	OSO_3^-	$COCONHSO_3^-$	0.02	
	C4	OH	OSO_3^-	H	$COCONHSO_3^-$	0.1	
GTXs	dcGTX2	H	H	OSO_3^-	CH_2OH	0.2	GTX2
	dcGTX3	H	OSO_3^-	H	CH_2OH	0.4	GTX3
	GTX1	OH	H	OSO_3^-	$COCONH_2$	1.0	GTX1
	GTX2	H	H	OSO_3^-	$COCONH_2$	0.4	GTX2
	GTX3	H	OSO_3^-	H	$COCONH_2$	0.6	GTX3
	GTX4	OH	OSO_3^-	H	$COCONH_2$	0.7	GTX4
	GTX5	H	H	H	$COCONHSO_3^-$	0.1	
	GTX6	OH	H	H	$COCONHSO_3^-$	0.1	
STXs	dcSTX	H	H	H	CH_2OH	1.0	dcSTX
	STX	H	H	H	$COCONH_2$	1.0	dcSTX
	NEO	OH	H	H	$COCONH_2$	1.0	NEO
	dcNEO	OH	H	H	CH_2OH	0.4	NEO

■分析条件

LCとMSの分析条件を表２に示します。

表2　分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™)

Column : Hydrophilic Interaction (HILIC) Column/Amide ※ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)

Mobile phases : A) 0.015% formic acid+0.015% Ammonium water
B) 0.01% formic acid in Acetonitrile: water=7:3

Column temp. : 60 ℃

Injection volume : 2 µL

Time program :

Time (min)	Flow rate (mL/min)	A.Conc (%)	B.Conc (%)
5.00	0.4	2	98
8.50	0.4	50	50
10.00	0.6	50	50
10.10	0.6	2	98
15.00	0.6	2	98

[MS conditions]　(LCMS™-8060NX)

Ionization : ESI Positive & Negative

Interface voltage : +1 kV & -1 kV

Ion Focus voltage : +2 kV & -2 kV

Nebulizing gas flow : 3 L/min

Heating gas flow : 15 L/min

Drying gas flow : 3 L/min

IF/DL/HB temp. : 300/250/400 ℃

CID gas pressure : 270 kPa

ESI probe position : +4 mm

※ 参考文献を参照

■トランジション

分析に用いたMRMトランジションを表3に示します。これら設定によりポジティブ・ネガティブモード同時検出を実施しました。

表3　MRMトランジション

Analog	Ret. Time (min)	Polarity	MRM Transition 1	Collision Energy (V)	MRM Transition 2	Collision Energy (V)
STX	8.94	+	300.1>204.1	-20	300.1>138.0	-20
NEO	8.95	+	316.1>126.1	-24	316.1>220.1	-22
dcSTX	8.94	+	257.1>126.1	-22	257.1>220.1	-35
dcNEO	9.06	+	273.1>126.1	-20	273.1>225.1	-20
dcGTX2	7.08	-	351.1>164.0	20	351.1>333.1	20
dcGTX3	7.66	+	353.1>255.1	-20		
GTX1	7.11	-	410.1>367.1	18	410.1>349.1	20
GTX2	6.80	-	394.1>351.1	19	394.1>333.1	22
GTX3	7.65	+	396.1>298.1	-18		
GTX4	7.76	+	412.1>314.1	-18		
C1	3.68	-	474.1>122.0	33	474.1>351.1	25
C2	4.33	+	396.1>298.1	-23		

■前処理

前処理のプロトコルを図2に示します。抽出法は、酢酸抽出法と塩酸抽出法の2種類を実施し、比較を行いました。

酢酸抽出法は麻痺性貝毒とテトロドトキシン(ふぐ毒)を同時分析する際に用いられている方法、塩酸抽出法は国内のマウス毒性試験で用いられている方法です。

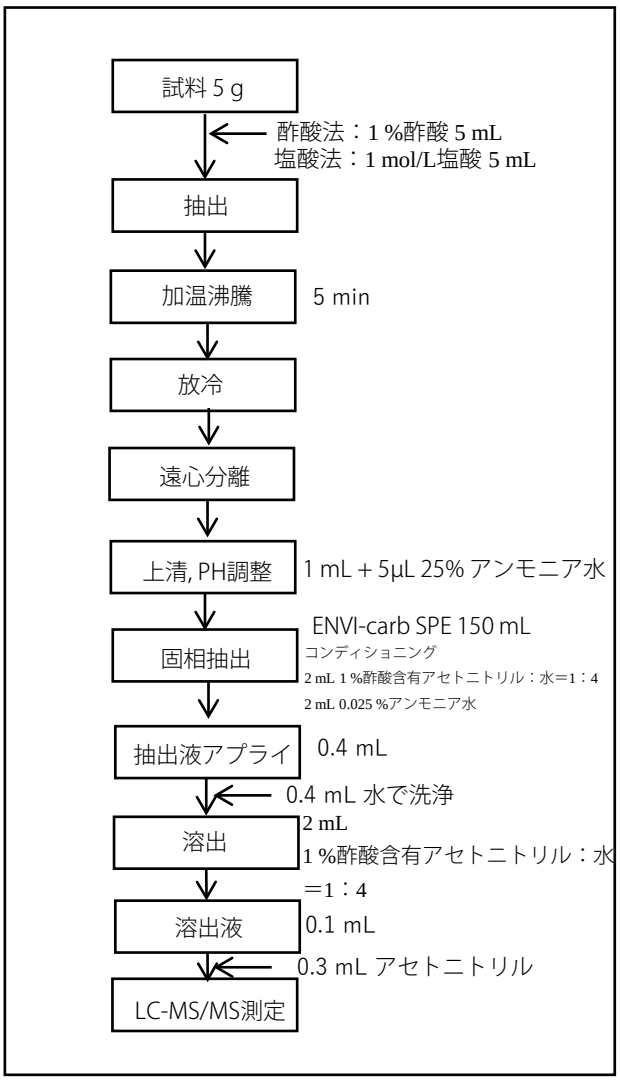

図2　前処理プロトコル

■STXsのクロマトグラム

毒化したホタテ貝を酢酸抽出法で処理し得られた試料のMRMクロマトグラムの一例を図3に示します。この試料には、GTX2の濃度が最も高く、次いでSTXが高濃度に含まれていました。

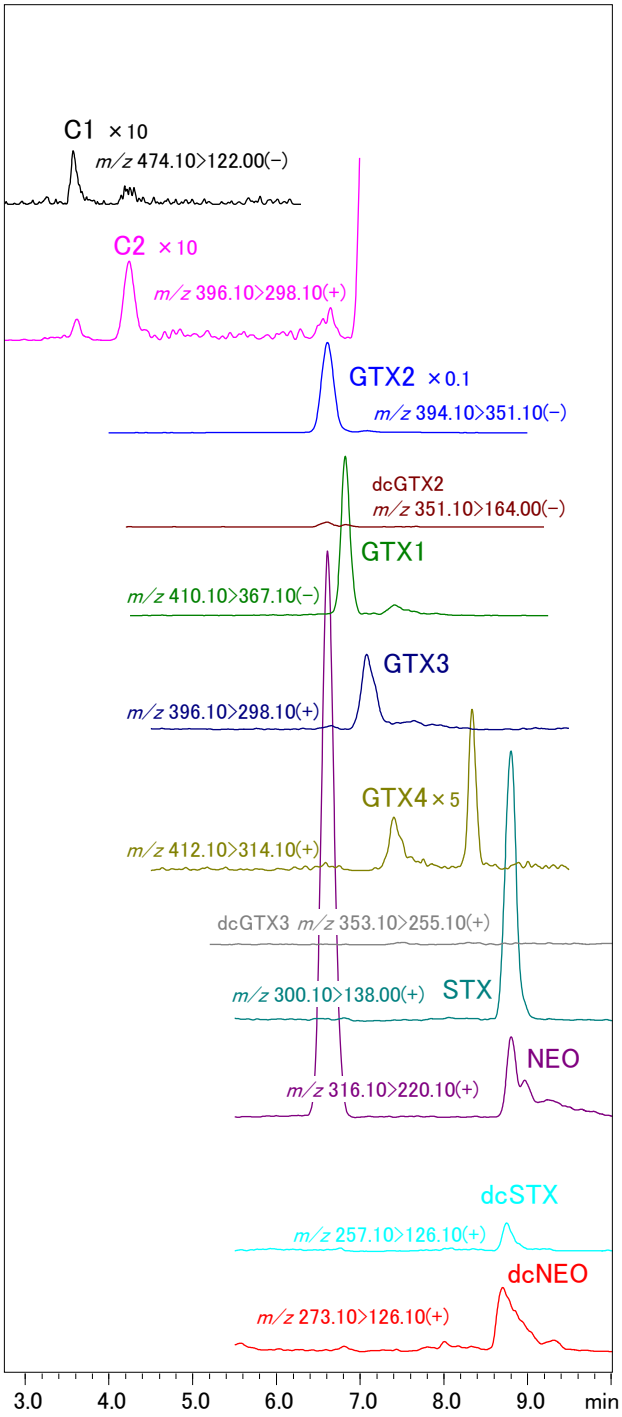

図3　ホタテ貝中STXsのMRMクロマトグラム

■検量線

図３の各分子種の検量線を、図4に示しました。各分子種、検量線の最小点濃度は、0.39～3.09 ng/mL 範囲の濃度でした。この濃度範囲は、0.0004～0.0031 mg/kgとなり、CODEXのCXS 292-2008で示されているLOD 0.01 ～0.1 mg/kgより十分に低い値となっています。

今回、標準品を入手できない分子種の定量は標準品を入手した分子種の検量線を用いて計算しました(表1参照)。STXはdcSTX、dcNEOはNEO、dcGTX2はGTX2、dcGTX3はGTX3の検量線を使用し計算しました。

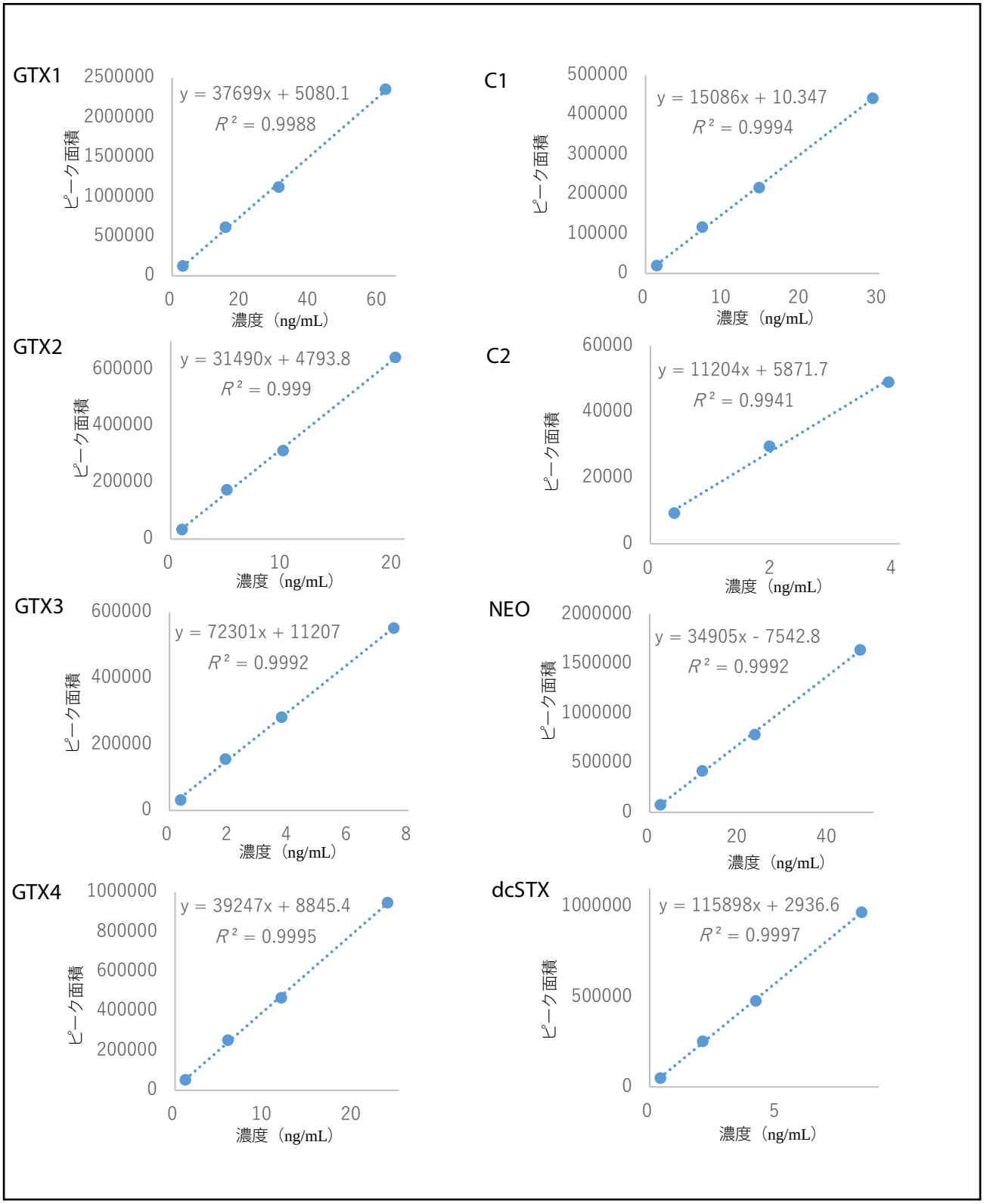

図4　各分子種の検量線

■定量結果

毒化した５つすべてのホタテ貝試料(A～E)からSTX類が検出されました。定量結果を図5に示します。また、図３で示したクロマトグラムは、試料Aです。

２つの前処理法はマウス毒性試験用である塩酸抽出法の方が定量値が低い傾向が認められました。この塩酸抽出法では、抽出液のpH調整不良、固相抽出での回収率低下、マトリックス効果などの可能性が考えられます。これらの結果から、LC-MS/MS法には酢酸抽出法がより適していると考えられました。定量値は、「各分析種の定量値(ng STX eq/g)＝各分析種の定量値(ng/g)×毒性等価係数(TEF)×サキシトキシン二塩酸塩の分子量÷各分析種の分子量」で、計算をしました。

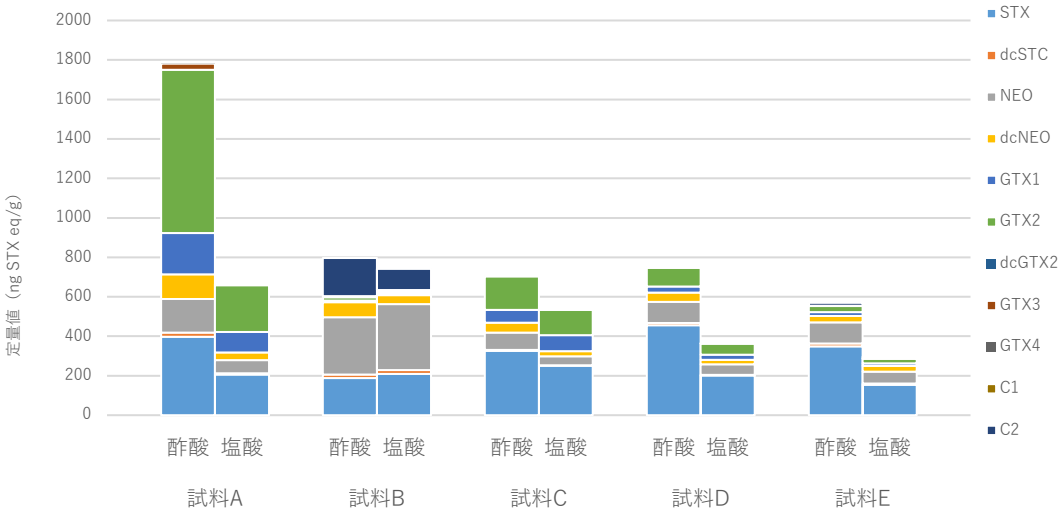

図5　５試料の定量値比較

■まとめ

マウス毒性試験にかわる麻痺性貝毒の機器分析法として親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を使用したLC-MS/MS法を紹介しました。シンプルなLCシステムで10 min以内に各分子種を検出し、高感度定量することが可能です。

ホタテ貝の前処理法については、酢酸抽出法の方がLC-MS/MS法に適していることが確認されました。

2020年10月には、EU から WTO を通じ Draftという形でSPS 通報が発出されました。ePing (epingalert.org)

今後近日中に、EUへ輸出する際には、(EU) 2019 627に則り、麻痺性貝毒 [Paralytic Shellfish Poison (PSP)] 毒素の検出について、動物を用いる必要のない代替法のみを用いることが要求されます。

また、将来的な国内での機器分析法通知の際には、各検査事業所において全分子種の標準品が購入できるような環境整備が望まれます。

参考文献
1) Boundy M. et al., J. Chromatography A, 1387, 1-12 (2015).
2) A. D. Turner et al., *J. AOAC Int.*, **98**, 3, 609-621 (2015).
3) A. D. Turner et al., *J. AOAC Int.*, **103**, 2, 533-562 (2020).

謝辞

標準品、試料、データ提供に関しまして、
一般財団法人日本食品検査様の多大なるご協力をいただきました。
心より、謝意を表します。

HOME｜JFIC 一般財団法人 日本食品検査 (jffic.or.jp)

LCMSおよびNexeraは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00364-JP　初版発行：2022年 03月

島津コールセンター 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

LCMS-8060NX
トリプル四重極質量分析計

LCMS-TQ RX シリーズ
トリプル四重極質量分析計

関連分野

食品・飲料

ライフサイエンス

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ